

**A MAKROFÁGOK ÁLTAL TERMELT RETINOID
SZEREPE A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ
KELETKEZÉSÉBEN ÉS A DEXAMETAZON
FAGOCITÓZIS FOKOZÓ HATÁSÁBAN**

GARABUCZI ÉVA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

A MAKROFÁGOK ÁLTAL TERMELT RETINOID SZEREPE A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ KELETKEZÉSÉBEN ÉS A DEXAMETAZON FAGOCITÓZIS FOKOZÓ HATÁSÁBAN

GARABUCZI ÉVA

OKLEVELES MOLEKULÁRIS BIOLÓGUS/BIOKÉMIKUS

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA, AZ MTA DOKTORA

DEBRECENI EGYETEM
FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

A Doktori Szigorlati Bizottság Elnöke:	PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, AZ MTA DOKTORA
A Doktori Szigorlati Bizottság Tagjai:	PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA IFJ. PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA
A Doktori Szigorlat Időpontja:	2015. December 4. 9:00.
A Doktori Szigorlat Helye:	DE ÁOK, Konzerváló Fogászati Tanszék.
Az Értekezés Bírálói:	PROF. DR. KIRSTEN LAUBER, PhD DR. BÁCSI ATTILA, PhD
A Bírálóbizottság Elnöke:	PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, AZ MTA DOKTORA
A Bírálóbizottság Tagjai:	PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA IFJ. PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. KIRSTEN LAUBER, PhD DR. BÁCSI ATTILA, PhD
Az Értekezés Védésének Időpontja:	2015. December 4. 13:00.
Az Értekezés Védésének Helye:	DE ÁOK, In Vitro Diagnosztikai Épület Tanterme.

1. BEVEZETÉS

1.1. Az apoptózis

Az 'apoptózis' Kerr és munkatársai által 1972-ben bevezetett fogalom egy különleges alaki sajátosságokat mutató sejthalál típus meghatározására. Az apoptózis a számos programozott sejthalál forma egyike, melyet morfológiai változások egész sorozata jellemez. Például a sejtek felkerekednek, a citoplazma és a sejtmag membrán hasadás nélkül zsugorodik (piknózis), a sejtmag szétesik (karyorrhexis), valamint a plazmamembránon úgynevezett „bleb”-ek jönnek létre (a sejtmembrán integritását megtartva a folyamat végéig). Ezek a folyamatok apoptotikus testek keletkezéséhez vezetnek, amik citoplazma lefűződésekké melyekbe sejtmag részletek is bekerülhetnek. Ezen lefűződött organellek integritása sokáig megtartott, őket teljesen intakt sejtmembrán határolja. Az apoptotikus testeket fagociták kebelezik be és fago-lizoszómáikban lebontják. Az apoptózis folyamata és az apoptotikus sejtek eltávolítása nem jár gyulladásos reakcióval, mivel az apoptotikus sejten lévő sejttartalom nem „ömlik ki” az őket körülvevő szövetbe; gyorsan fagocitálódnak a szomszédos sejtek által, így megelőzve a másodlagos nekrosis kialakulását, emellett a fagocitózist végző sejtek nem termelnek gyulladásos citokint az apoptotikus sejtek hatására.

1.2. Retinoidok

A retinoid szó jelentése "retinolhoz hasonló". Retinoidok az A vitamin (retinol), valamint annak természetes és szintetikus származékai. A retinol a táplálékkal kerül szervezetünkbe, vagy mi magunk is előállíthatjuk az A vitamin proformáiból. A retinsav (RA) az A vitamin egyik természetes (aktív származéka, mely nélkülözhetetlen az embriogenezishez és számos folyamathoz a sejten úgy, mint a sejtosztódás, differenciáció és apoptózis.

Retinsav szintézise

A transz retinsav (ATRA) a retinolból keletkezik egy kétlépéses oxidációs-reakcióban. Az első lépés a retinol oxidálása retinaldehiddé mely a sebesség-meghatározó lépése a szintézisnek. Ezt követi a retinaldehid oxidálása retinsavvá. A keletkező retinaldehid visszaalakítható retinollá, de a retinaldehid oxidálása retinsavvá már nem megfordítható reakció. Két különböző enzim felelős a retinol retinaldehid átalakításért: a citoszolikus alkohol dehidrogenázok (ADH) és a mikroszómális rövid-láncú dehidrogenáz/reduktázok (SDR). A reakció második lépésében, mely a transz-

retinaldehid oxidációja transz-retinsavvá, az aldehid dehidrogenáz (ALDH) 1A családdhoz tartozó, fiziológiás körülmények között nélkülözhetetlen enzimek: az ALDH1A1 (RALDH1), az ALDH1A2 (RALDH2), és az ALDH1A3 (RALDH3). Az ALDH1A1 *in vivo* szerepét bizonyítja, hogy ALDH1A1 -/- egerek bár életképesek és nincs morfológiai eltérés a retinájukban, azonban a májban csökkent mértékű a transz-retinsav bioszintézise és megemelkedett a szérumban a retinaldehid szintje is retinol adását követően. Az ALDH1A1 és ALDH1A2 katalitikus-hatékonysága közel azonos, de az ALDH1A2 K_m hányadosa sokkal alacsonyabb mint az ALDH1A1-é. Így, az ALDH1A1 a leghatékonyabb retinaldehid dehidrogenáz a három enzim közül. Ha túlságosan magas az ATRA koncentrációja a szervezetben, a CYP26 enzimek aktivitásának fokozásával az ATRA indukálja saját maga lebontását.

1.3. A retinoidok hatására aktiválódó magreceptorok

A sejtmagban a retinoidok magreceptorokhoz kötődnek emlős sejtekben, melyek ligand által aktiválódó transzkripciós faktorként működnek. A ligand kötődése egy konformációs változást eredményez a magreceptorban, melynek hatására transzkripciós aktivitásuk elindul. A retinsavak a retinsav receptort (RAR) és a retinoid X receptort (RXR) aktiválhatják. A RAR receptorok az RXR receptorokkal együtt heterodimerként funkcionálnak. Aktiváló ligand hiányában az RAR/RXR heterodimer korepresszor komplexekkel összekapcsolva kötődik a DNS retinsav válaszadó eleméhez (RARE), ezáltal előidézve egy inaktív transzkripciós állapotot. A retinsav kötődése a receptorához kiváltja annak konformációs változását, ezáltal lehetővé teszi a koaktivátor komplexek kötődését és a korepresszorok felszabadulását, mely a kromatin dekondenzációját és a target gének átíródását eredményezi. A RXR nagy affinitású ligandja a 9-cisz retinsav, mely egy egyszerű izomerizációs reakció után keletkezik transz-retinsavból. A RAR a transz-retinsav és a 9-cisz retinsav kötésére egyaránt képes. A 9-cisz retinsav fiziológiai szerepe ellentmondásos, mivel nehezen kimutatható a szervezetben, mind embriókban mind felnőtt szövetekben. Ezzel ellentétben az ATRA sok szövetben könnyen kimutatható. 3 különböző gén kódolhatja az RAR-t és az RXR-t is, melyek az evolúció folyamán megőrződtek. A makrofágokban az RAR α és az RAR γ fejeződik ki, az RXR esetében az RXR α -t és az RXR β -t találhatjuk meg. A magreceptorok családjában az RXR különleges helyet foglal el, mivel általános heterodimerizációs partnereként működve az RAR mellett sok más magreceptorhoz is kötődik, mint például a Máj X receptorok (LXR) -hoz és a peroxizóma-proliferáció-aktiválta receptorok (PPAR)-hoz stb. Az RXR egy "csendes" transzkripciós partner az RAR-RXR heterodimerben. Ebben az esetben, az RAR-t aktiváló ligand hiányában a transzkripció nem lehetséges, még akkor sem, ha az RXR mint partner egy agonista ligandot köt. Az RXR más heterodimerizációs partnerei esetében, mint "permisszív" receptor

működik, vagyis a heterodimer, önmagában egy RXR liganddal is aktiválható. Az LXRs receptorok hasonlóan a PPARs-hoz permisszív heterodimert képeznek az RXR receptorral, vagyis a komplex mindkét partner oldaláról aktiválható és a receptorok ligálása által szinergista vagy additív hatás is érvényesülhet.

Az LXR-ok – vagyis az LXR α és LXR β – központi jelentőségű szerepet töltenek be a zsírsav- és koleszterin anyagcsere transzkripciós szintű szabályozásában. Az LXR-ok oxiszteol érzékelőként működnek, és nélkülözhetetlen tagjai egy a koleszterin anyagcserét és szállítását irányító fiziológiai visszacsatolási huroknak. Az LXR α nagymértékben fejeződik ki a májban, kisebb mennyiségben található meg a bélben, a zsírszövetben és a makrofágokban, míg az LXR β szinte minden szövetben expresszálódik. Az LXR-t aktiváló ligand elősegíti a reverz koleszteol szállítását, melynek során koleszteint szállító (ABCA1 és ABCG1) és koleszteint megkötő (apoE és apoC) fehérjék, valamint lipoprotein szerkezet átalakító fehérjék szintjének növelésével a makrofágokban lévő felesleges kolesztein elszállítódik. A 27-hidroxiholeszteol egyike a számos oxiszteol molekulának, melyet lehetséges endogén LXR ligandként azonosítottak. Egy mitokondriális p450 enzim a CYP27 termeli a 27-hidroxiholeszteolt. Az enzim kifejeződés növelését követően megnő a 27-hidroxiholeszteol szintje és az LXR által szabályozott folyamatok is felerősödnek. A CYP27 gén a retinoidok és a PPARs ligandok szintjével összhangban szabályozódik, a promóterén lévő PPAR-retinsav receptor válaszadó elem segítségével.

A PPAR-ok (vagyis a három különböző PPAR fehérje: a PPAR α , PPAR β/δ és a PPAR γ) által szabályozott gének fontos szerepet töltenek be a sejtek differenciálódásában és különféle anyagcsere folyamatokban, főleg a glükóz és lipid homeosztázisban. A PPAR δ (más néven PPAR β) egy szinte minden szövetben kifejeződő magreceptor. A PPAR δ részt vesz a zsírsavak oxidálásában a váz- és szívizomban, de szabályozza a vér glükóz és kolesztein szintjét is. Továbbá, a PPAR δ aktivációja a zsírsavoxidációhoz szükséges gének kifejeződését váltja ki fehér- és barna zsírszövetben, valamint szétkapcsoló fehérjét (UCP) aktivál a barna zsírszövetben, melyek segítségével a megtermelt energia hőként vesz el, így csökkentve a zsírszövet mennyiségét.

1.4. Glükokortikoidok

A glükokortikoidok (GC) az emberi élethez nélkülözhetetlen szteroid hormonok, valamint nagyon hatékony gyulladáscsökkentő és T sejt apoptózist kiváltó szerek. A GC-ok széleskörű gyulladáscsökkentő és immunszuppresszáns hatásukat a glükokortikoid receptorhoz (GR) kötődve fejtik ki. Lipofil anyagok, így passzív módon képesek átdiffundálni a plazmamembránon és kötődni a citoplazmában lévő receptorukhoz. A GR ligand hiányában chaperonokkal (dajkafehérjék) képez heterokomplexet a citoplazmában. Amint a glükokortikoid kötődik receptorához, a chaperonok elválnak, a heterokomplex szétesik, melynek következményeként a GR a sejtmagba vándorol és célgénnek promóterében lévő GC válaszadó elemekhez kötődik.

A GC-ok szintetikus származékai úgy, mint a dexametazon vagy a prednizolon, a gyulladásos betegségek kezelésében széleskörűen használt szerek. A GC-ok egyik jól ismert immunszuppresszáns hatása, hogy hatékonyan fokozzák az apoptotikus sejt felvételét humán és eger makrofágok használatával. A GC-ok a különféle célgénjeik génexpresszióját fokozzák, részben így válják ki a megnövekedett fagocitózist. Kimutatták, hogy humán makrofágok rövid idejű (16 óra) glükokortikoid kezelése több mint 100 gén kifejeződését képes befolyásolni, ide értve azokat is melyek az apoptotikus sejtek fagocitózist szabályozzák úgy, mint a Mer receptor tirozin kináz (MERTK), az MFG-E8 vagy a C1q szérum fehérje.

1.5. A timociták fejlődése és szelekciója

A timusz elsődleges feladata az érett T sejtek létrehozásával egyidőben a fejlődés során nagyszámban keletkező használhatatlan vagy veszélyes timociták eltávolítása. A csontvelőből vagy a magzati májból származó pluripotens hematopoetikus őssejtek a timuszba vándorolnak, ahol timocitákká majd végül érett T sejtekké fejlődnek. A T sejt fejlődése során, az éretlen CD4-CD8-dupla negatív (DN) pre T sejtek, érett CD4+ vagy CD8+ egyszeresen pozitív (SP) T sejtekké válnak a CD4+CD8+ dupla pozitív (DP) fejlődési stádiumon keresztül. A differenciálódás során, a keletkező CD4+CD8+ timociták 90%-a nem képes felismerni a saját fehérjét tartalmazó saját MHC molekulák komplexét a timuszban és egy „neglekcio általi sejthalál” programban lépnek. A T sejt szelekció és differenciáció folyamán a CD4+CD8+ timociták negatív (halál) és pozitív (túlélés) szelekción mennek keresztül, hogy létrehozzák a működőképes T sejt repertoárt.

Az elhaló timocitákat a timuszban lévő makrofágok fagocitálják. A bekebelezést követően a makrofágok különféle anyagokat bocsátanak ki, melyek hatással vannak a dupla pozitív timociták apoptózisára, egyúttal megelőzik a gyulladáskeltő citokinek termelődését. Egyik oldalról a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), a prostaglandin E_2 (PGE $_2$) és az adenosin mint

gyulladáscsökkentő molekulák termelődnek és autokrin módon a makrofágokon hatnak. Másik oldalról mind az adozin mind a PGE₂ kiválthatja a timociták apoptózisát, míg a TGF- β a glükokortikoid- és a TCR-függő sejthalált támogatására képes. Mivel az apoptózis és következeképp az elhaló sejtek fagocitózisa egy folyamatosan zajló folyamat a tímuszban, a fagocitáló makrofágok által szekretált anyagok hozzájárulnak egy olyan tímikus környezet kialakításához, amely a TCR jelátvitel hiányában biztosítsák az apoptózis kiváltását a neglektált timocitákban.

Régóta ismert, hogy a timociták fejlődésére hatással vannak a tímuszban megjelenő GC-ok is, melyeket a tímikus epitéliális sejtek termelnek vagy a mellékvese kéregből származnak.

1.6. A 2-es típusú transzzglutamináz

A transzzglutamináz fehérjecsald kilenc tagja közül a 2-es típusú transzzglutamináz (TG2), más néven szöveti transzzglutamináz (tTG), a legnagyobb mennyiségben jelenlévő és a legtöbbet tanulmányozott enzim. A transzzglutaminázok keresztkötő enzimek, melyek a lizin oldalláncok ϵ -amino csoportja és a glutamin oldalláncok γ -karboxil csoportja közötti kereszttételek létrehozását katalizálják, vagy molekulán belüli kötéseket hoznak létre fehérjékben di- és poliaminok beépítésével. A TG2 egy multifunkciós fehérje, több mint 130 szubsztrátja létezik különböző helyeken, a sejten belül és kívül. A keresztkötő képessége mellett, diszulfid-izomeráz és protein kináz aktivitással is rendelkezik. G-fehérjeként működve számos jelátviteli útvonalban részt vehet. Továbbá, nem-enzimatis fehérje kölcsönhatásokban is részt vesz, melyek különösen a sejten kívül fontosak, ahol a TG2 számos sejt felszíni fehérjével áll kölcsönhatásban, hogy az extracelluláris mátrix sejt adhéziós és stabilizációs folyamataiban vegyen részt.

Ismert, hogy a TG2 indukálódik és aktiválódik apoptotikus sejtekben. Általánosságban, a TG2 legfontosabb *in vivo* szerepe annak biztosítása, hogy ha az apoptózis folyamata elkezdődött, az végbe is menjen anélkül, hogy gyulladást vagy szöveti sérülést okozna. A TG2 az apoptózis során erősen keresztkötött fehérje polimereket hoz létre keresztkötő aktivitásával az apoptotikus testekben, ahol az irreverzibilisen keresztkötött fehérje aggregátumok stabilizálják az elhaló sejteket így megelőzve a környezetre ártalmas intracelluláris sejtalkotók kiömlését a sejtől. A timocitákban a TG2 a sejthalál korai szakaszában indukálódik, és nemcsak az *in vivo* enzim mennyisége, de az aktivitásának növekedése is kimutatható.

A foszfátidilszerint kötő receptorokon keresztül az apoptotikus sejtek felismerése – amely az elhaló sejtek fagocitózisának első lépése – a makrofágokból látens TGF- β felszabadulását idézi elő. Ezzel egyidőben a fagociták TG2-t termelnek, mely a TGF- β -t aktiválja. TGF- β receptorok jelen vannak mind a makrofágokon mind az apoptotikus sejteken. A TGF- β hozzájárul a specifikus szignál

által előidézett apoptózishoz és a TG2 kifejeződését is indukálja az elhaló timocitákban, mialatt a makrofágokban a TGF- β elősegíti a fagocitózist, valamint a gyulladáskeltő citokinek keletkezését gátolja. A makrofágokban a TGF- β általi TG2 indukció egy önszabályozó folyamatot eredményez, amely további TGF- β keletkezéshez és felszabaduláshoz vezet.

1.7. Az apoptotikus sejtek felvétele

Testünkben minden nap sejtek billiói halnak el, hogy megszabaduljunk azoktól, melyek ártalmasak, haszontalanok vagy előregedtek. A "fagocitózis" szó egy bekebelező folyamatra vonatkozik, melynek során nagyobb részecskék, mint például baktériumok és halott/elhaló sejtek kerülnek felvételre, majd alkotóelemeik egy membránnal körülvett vezikulumban melyet fagoszómának hívnak, feldolgozásra kerülnek. Az apoptotikus sejtek gyors és hatékony eltávolítása a fagociták által, megelőzi a potenciálisan cititoxikus, immunogén vagy gyulladást kiváltó sejttartalom kikerülését a környező szövetekben. A nem fagocitált apoptotikus testek másodlagos nekrozison mehetnek keresztül, így hozzájárulhatnak gyulladásos és autoimmun kórképek kialakulásához.

Az apoptotikus sejtek fagocitózisa négy különböző szakaszra osztható: a fagociták toborzása azon a helyen ahol az apoptotikus sejtek megtalálhatóak; az elhaló sejtek felismerése számos receptor és hídképző molekula segítségével; a sejtek bekebelezése egy sajátos felvételi folyamat által; a bekebelezett sejtek feldolgozása a fagocitákban.

Az apoptotikus sejtek speciális jelzőmolekulákat fejeznek ki a felszínükön (úgynevezett "eat me" szignálokat) melyeket a fagociták felszínén lévő specifikus receptorok ismernek fel. Az apoptotikus sejtek eltávolításához nélkülözhetetlen és egyben legjobban jellemzett "eat me" szignál a foszfátidilszerin megjelenése a sejt külső felszínén. Ezek az "eat me" szignálként szolgáló molekulák egyrészt közvetlenül kapcsolódhatnak a makrofágok felszínén lévő receptorokkal, másik oldalról hídképző molekulákhoz kötődhetnek, melyek hídként szolgálnak az apoptotikus sejtek és a fagociták között. Az apoptotikus testecskék felvétele során különböző jelátviteli útvonalak vezethetnek a Rac aktiváció következtében lezajló citoskeleton átrendeződéshez, mely az állbak képződését szolgálja. Az apoptotikus sejtek felismerését és felvételét követően a fagocitózis folyamata még nem teljes, mivel a bekebelezést követően történő számos esemény (pl. fagoszómák érése) is befolyásolhatja még a fagociták felvevőképességét. Az apoptotikus sejtek alap építőkövekre bomlanak, mint pl. a nukleotidok, zsírok, szterolok és fehérjék.

Az apoptotikus sejtek felvételének számos következménye van, így például a fagocitáknak kezelniük kell az apoptotikus sejtekből származó intracelluláris alkotóelemeket. Egyike ezen komponensek az apoptotikus sejtben lévő lipidek, amelyek aktiválhatják a fagocitáló makrofágok

lipid érzékelő receptorait. Az LXR és a PPAR receptorok, mint lipid érzékelő magreceptorok, válaszolnak erre a lipid felvételre és megnövelik a fagocitózisban résztvevő receptorok és hídképző molekulák számát csakúgy, mint a fagocitáló makrofágok anyagcseréjét a transzkripció szabályozásán keresztül. Ezen a módon a fagocitáló makrofágok érzékelik az apoptózis mértékét és elősegítik az elhaló sejtek gyors és korai eltávolítását.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A TG2-ről régóta ismert, hogy kapcsolódik az *in vivo* apoptózis folyamatához különféle sejttípusoknál, ide értve a T sejteket is. Az apoptózis *in vivo* kiváltása timocitákban a TG2 megjelenéséhez vezet. Habár a timociták apoptózisa *in vitro* is előidézhető, bennük a TG2 szintje nem növekszik. Ez arra utalt, hogy olyan faktorok nélkülözhetetlenek a TG2 *in vivo* indukciójához az elhaló timocitákban melyek csak a szöveti környezetben vannak jelen. A laborban folyt korábbi munkákból ismert volt, hogy e faktorok egyike a TGF- β , melyet az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok termelnek. A TGF- β mellett, a TG2 promóter retinsav válaszadó elemet is tartalmaz. A retinoidokról ismert volt, hogy termelődnek a timuszban.

- Mivel az *in vitro* adott TGF- β nem képes a TG2 expresszió jelentős növelésére apoptotikus timocitákban, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk valyon *in vivo* apoptózis folyamán a timuszban jelenlévő retinoidok, a makrofágok által termelt TGF- β -val együttműködve közreműködhetnek-e a TG2 szint növelésében.

Ezen kísérleteinkben azt találtuk, hogy a dexametazon-indukálta *in vivo* timocita apoptózis során a timuszban jelenlévő apoptotikus sejteket felvevő makrofágok retinoidot termelnek, mely szabályozza a TG2 kifejeződését a timocitákban és egyúttal fokozza a makrofágok fagocitáló képességét is. Mitöbb a dexametazon kezelés önmagában is növelte a RALDH1 kifejeződését makrofágokban.

- Mivel korábbi tanulmányok bemutatták, hogy a glükokortikoidok az immunsuppresszáns hatásukat részben az apoptotikus sejtek fagocitózisának fokozásán keresztül fejtik ki, és a laborunkban folyt munka azt bizonyította, hogy a retinoidok fokozzák a makrofágok apoptotikus sejteket felvevő képességét, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk a dexametazon által indukált retinoid termelődés hozzájárulhat-e a dexametazon fagocitózist fokozó hatásához.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteink során 4 hetes és 2-4 hónapos vad típusú C57BL/6 egereket használtunk. Néhány kísérletben RAR α hiányos egeret és RARE-hsp68-lacZ riporter transzgén egereket használtunk. Minden kísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével történt.

Makrofágok izolálása és tenyésztése

A makrofágokat 2-4 hónapos C57BL/6 egerekből, steril fiziológiás sóoldattal történő hasüregi mosással nyertük. A sejtek 12-lyukú tenyésztőedényben (1.5×10^6 sejt/lyuk) tettük és 3-4 óráig inkubáltuk miután a nem letapadt sejteket elmostuk, majd 2 napon keresztül RPMI 1640 médiumban (10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 50 μ M 2-merkaptóetanol) termosztátban (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük. A le nem tapadt sejteket az izolálás után 3-4 órával, majd naponta lemostuk. A hasüregi makrofágokat a következő anyagokkal kezeltük: 1 μ M GW3965-el egy szintetikus máj X receptor (LXR) agonistával, 1 μ M Roziglitazonnal egy PPAR γ agonistával, 1 μ M GW501516 egy szintetikus PPAR δ agonistával, 4 órán keresztül vagy 0.1 μ M dexametazonnal (DEX) 12 vagy 24 óráig.

Csontvelői sejtekből differenciáltott makrofágok (BMDM) esetében a sejteket vad típusú és RAR α knock out egerek, vagy RARE-hsp68-lacZ egerek combcsontjából izolált csontvelőből nyertünk ki, majd DMEM tápfolyadékban (10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 50 μ M 2-merkaptóetanol) GM-CSF jelenlétében (20% L929 fibroblaszt sejtfelülűszo) termosztátban 5 napon keresztül tenyésztettük. A sejteket 1 μ M DEX-al, 25 μ M 4-dietilamino-benzaldehid-el (DEAB), 1 μ M GSK3787-el egy PPAR δ antagonistával, 1 μ M AGN193109-el egy pan RAR antagonistával, 20 μ M cycloheximiddel (új fehérje szintézisének gátlása), kezeltük az egyes kísérleteknél megadott módon és ideig. A hosszútávú fagocitózis vizsgálatához apoptotikus timocitákat adtunk BMDMs-hoz és 5:1 (apoptotikus sejt : makrofág) arányban inkubáltuk 3 órán át, majd az apoptotikus sejteket a makrofágok alapos mosásával távolítottuk el.

In vivo retinsav szintézis gátlása

A tímusz endogén retinoid szintézisének gátlásához, 4 hetes egereket oltottunk egy alkohol dehidrogenáz inhibitorral (diszulfiram) vagy egy retinaldehid dehidrogenáz inhibitorral (DEAB). A diszulfiram esetében 1.33 mg/g testtömeg az első napon, 0.33 mg/g a 2. és 3. napon, a DEAB-al

való kezelésnél 0.2 mg/g testtömeg az első napon, 0.1 mg/g a 2. és 3. napon. A timociták apoptózisát dexametazonnal váltottuk ki a harmadik napon az utolsó dózis inhibitorral együtt oltva.

Az *in vivo* timocita apoptózis kiváltása

4 hetes egereket intraperitoneálisan oltottunk 0,3 mg DEX-al - DMSO/fiziológiás sóoldatban beoldva - vagy 50 µg anti-CD3 antitesttel, így indukálva az apoptotikus timociták keletkezését a timuszban. A kontroll egerek a kezelt egerekkel megegyező dózisban kaptak DMSO/fiziológiás sóoldat keveréket. Az oltás után timuszt eltávolítottuk az egerekből a kísérletekben megjelölt kezelési időket követően. A timusz eltávolítását követően mértük a kontroll és a kezelt egerekben a timusz súlyát, ebből következtetve az elhalt sejtek mennyiségére a kezelt egerekben a kontroll egerekben mért timusz súlyhoz képest.

Az *in vitro* timocita apoptózis kiváltása

A TG2 expresszió méréséhez a sejteket (10^7 sejt/ml) 10%-os aktív szén kezelt FBS -t tartalmazó RPMI 1640 médiumban kezeltük, a médiumot kiegészítve 2 mM glutamminal, 1 mM Na-piruváttal, 100 U/ml penicillinnel és 100 mg/ml sztreptomocinnel, majd 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett inkubáltuk. Az apoptózist 0,1 µM DEX adásával váltottuk ki. A kísérletben a timocitákat 5 ng/ml humán rekombináns TGF-β-val, 0,3 µM transz vagy 9-cisz retinsavval, 0,3 µM AM580-nal vagy 1 nM LG268-al kezeltük különböző kombinációkban, az egyes kísérleteknél jelzett időtartamig.

Western blot

A BMDM-ok vagy az izolált timuszokokat homogenizáltuk jéghideg 0,5%-os Triton X-et tartalmazó lízis pufferben. Az egyes minták fehérje koncentrációját 2 mg/ ml-re hígítottuk, majd egyenlő térfogatú Laemmli puffert adtunk hozzá és a mintákat 100°C-on 10 percig forraltuk. A fehérjék elválasztását 10%-os SDS-poliakrilamid géllal végeztük a TG2 esetében, míg 15%-os gélen a LXR, PPARδ és C/EBPβ esetében, detektálásuk pedig PVDF membránon történt anti-TG2, anti-LXRα/β , anti-PPARδ , anti-C/EBPβ és anti-β-actin vagy GAPDH antitestek felhasználásával.

A peritoneális makrofágok RALDH kifejeződésének vizsgálata az apoptotikus sejtek *in vitro* fagocitózisát követően

Az apoptotikus sejtként 4 hetes vad típusú egerek timuszából származó timocitákat vagy NB4 (promielocitás leukémia sejtvonala) sejteket használtunk. Az apoptózist 24 órás, szérumentes RPMI 1640 médiumban (100 U/ml penicillin/streptomycin) történő tenyésztéssel értük el. NB4 promielocitás leukémia sejtek esetében korábbi tanulmányok alapján As₂O₃-kezeléssel (10 µM, 12 óra) indukáltunk apoptózist. FACS analízis (AnnexinV-FITC/propidium-jodid) alapján mindkét

módszer esetében az apoptotikus sejtek aránya meghaladta a 80%-t a sejt kultúrákban. Az apoptotikus timocitákat 10:1 arányban adtuk a peritoneális makrofágokhoz, míg az apoptotikus NB4 sejteket 5:1 arányban alkalmaztuk. Az apoptotikus sejteket a makrofágokkal 6 órán át együtt inkubáltuk, majd az apoptotikus sejtek eltávolítását követően a makrofágokat további 6 vagy 18 órán át inkubáltuk a mintákból történő RNS izolálás előtt.

BMDM-ok *in vitro* fagocitáló képességének vizsgálata

A BMDMs-okat 24 óráig kezeltük 5 μ M 5-6-(((4-klorometil)benzoi)amino)-tetrametilrodami (CMTMR) festékkel. Az apoptotikus timociták létrehozásához 4 hetes C57BL/6 egerek timuszából izoláltuk a sejteket, majd a fentebb leírt módon *in vitro* indukáltuk a timociták apoptózisát. A 6-karboxi-3,6-diacetilfluorescein (CFDA) (6 μ M) festékkel jelölt apoptotikus timocitákat a BMDM-hoz adtuk 5:1 (apoptotikus sejt/makrofág) arányban 30 percre (vagy 45 percre a transzfektált makrofágok esetében), majd a fagocitózis után az apoptotikus timocitákat lemostuk. A hosszútávú fagocitózis vizsgálatához a BMDMs-ok 3 órán át nem jelölt apoptotikus timocitákat fagocitáltak, majd 30 percig CFDA jelölt timocitával inkubáltuk a makrofágokat a fagocitáló képesség meghatározásához. Mosást követően a sejteket áramlási citometriával analizáltuk.

mRNS kifejeződés meghatározása

Totál RNS-t a kontroll és kezelt timuszokból, az izolált timocitákból vagy makrofágokból izoláltuk, TRI-reagens felhasználásával, a gyártó által megadott instrukciók alapján. A minták koncentrációját és tisztaságát Nanodrop Spektrofotométer segítségével mértük. A totál RNS (1 μ g/ minta) cDNS-sé történő átírásához High Capacity cDNA RT Kitet használtunk. A génexpressziós változások detektálása valós idejű kvantitatív PCR technikával történt, melyhez génspecifikus FAM-MGB-jelölt primereket és próbákat tartalmazó oligomixeket (TaqMan Gene Expression Assay) használtunk. A lacZ génexpresszió méréséhez egy FAM-TAMRA jelölt TaqMan próbát használtunk. A mintákat ABI Prism 7900 vagy Roche LightCycler LC 480 segítségével triplikátumokban futtattuk. Az adatok kiértékelése SDS 2.1 programmal történt. A génexpressziós szinteket komparatív CT (ddCT) módszerrel határoztuk meg, melyhez normalizáló génként ciklofilin D-t vagy glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH)-t használtuk.

A RALDH1 és 2 kifejeződés vizsgálata a timuszban immunfestés alkalmazásával

A kísérlethez használt timuszokat az egerek DEX oltását követően 24 órával izoláltuk. A makrofágok fluoreszcens fénymikroszkópos meghatározása (F4/80 pozitív sejtek) mellett a RALDH1 vagy RALDH2 enzimeket detektáltuk fagyasztott timusz szöveti metszetet használva

(folyékony nitrogénnel történt fagyasztás beágyazó médium segítségével). A felvételeket Olympus DP50 kamera és Nikon Eclipse 800 használatával készítettük.

DEX-kezelt BMDM-ok X-gal festése

RARE-hsp68-lacZ riporter transzgén egerekből származó BMDMs-okat kezeltünk 1 μ M DEX-al vagy 25 μ M DEAB-al (a kontrollok esetében DMSO-val) 24 óráig. A sejteket 0.25 mM glutáraldehiddel jégen fixáltuk 5 percig. A fixált sejteket 37 °C -on 24 órára X-gal festőoldatba helyeztük (35 mM potassium ferrocyanide, 35 mM potassium ferricyanide, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% Nonidet P-40, 1 mg/ml X-gal). A felvételeket AMG EVOS invert mikroszkóp használatával 20 X-os nagyítással készítettük.

BMDMs siRNS-el való transzfektálása

A BMDMs-okat egér LXR α és LXR β vagy C/EBP β ON-TARGETplus SMARTpool siRNS-el transzfektáltuk. Kontrollként ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool siRNS-t alkalmaztunk. A transzfektálásokat DharmaFECT 1 transzfektációs reagenssel végeztük, a gyártó által megadott protokoll alapján. siGLO Green (6-FAM) transzfektációs indikátort használtunk a sikeres reakció kimutatására. A makrofágokat 24/48 órával a transzfektációt követően kezeltük 1 μ M DEX-al vagy a kontrolloknál DMSO-val 18/24 óráig, majd mértük az LXR és a C/EBP β mRNS/fehérje szintet a makrofágokban kvantitatív PCR/western blot segítségével. 48 órával a transzfektációt követően kezeltük a sejteket DEX-al (1 μ M) vagy DMSO-val a kísérleteknél megjelölt ideig, hogy mérjük az LXR vagy C/EBP β siRNS hatását a különféle glükokortikoid-indukálta fagocitózis-kapcsolt gének mRNS szintjére.

Statistikai analízis

A bemutatott eredmények legalább három, eltérő napon végzett, független kísérlet adatait mutatják be, melyeknél a szignifikanciát kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával adtuk meg ($p < 0.05$).

4. EREDMÉNYEK

4.1. AZ APOPTOTIKUS SEJTEKET FAGOCITÁLÓ MAKROFÁGOK RETINOIDOT TERMELNEK, AMELY HOZZÁJÁRUL A TG2 KIFEJEZŐDÉSÉHEZ TIMOCITÁKBAN

A retinsav és a TGF- β együttesen hatékonyan növelik a TG2 mRNS kifejeződését *in vitro* dexametazon hatására elhaló timocitákban

Kísérleteink során a timociták apoptózisát dexametazon (DEX) kezeléssel váltottuk ki. Elsőként megvizsgáltuk a retinsavak és a TGF- β lehetséges hatásait a TG2 mRNS kifejeződésére, önmagukban használva őket a sejtek kezelésére, vagy DEX-al együtt alkalmazva különböző kombinációkban. A timociták apoptózis indukciójához a laborban folyt előző tanulmányok során hatékonyan bizonyult retinoid és TGF- β koncentrációkat alkalmaztuk kísérleteink alatt. A TGF- β vagy az ATRA kezelés önmagában csak kevésbé növelte, míg a 9-cisz retinsav (9cRA) hatékonyan tudta indukálni a TG2 mRNS kifejeződését timocitákban. Ahogy korábban leírtuk, a timociták DEX kezelése nagyon hatásosan váltja ki a sejtek apoptózisát, de csak kevésbé befolyásolja a sejtek TG2 expresszióját. ATRA adásával sem tudtuk elősegíteni a DEX-indukálta TG2 kifejeződést, míg a TGF- β DEX-al együtt alkalmazva már hatékonyan növelte a TG2 mRNS kifejeződését a timocitákban. Az ATRA kezelés akkor bizonyult eredményesnek a TG2 mRNS szint növelésében, ha TGF- β -val, vagy DEX és TGF- β kombinációjával együtt alkalmaztuk a timocitákon. A 9-cisz RA esetében, a retinsav DEX-al vagy TGF- β -val alkotott kombinációja eredményesebb volt a TG2 szint növelésében, mint ugyanezen kezelések ATRA használatával, mely arra utal, hogy az RXR oldal vesz részt a TG2 expresszió kiváltásában az elhaló timocitákban. A 9-cisz RA és TGF- β kombinációja idézte elő leghatékonyabban a TG2 kifejeződését a DEX-kezelt timocitákban. Ez arra utal, hogy a glükokortikoid hormon által biztosított apoptotikus jel, ami önmagában nem volt elégséges a TG2 szint növeléséhez, amikor 9cisz RA-al vagy TGF- β -val kombinációban alkalmazzuk, szintén hozzájárul a TG2 megjelenéséhez.

Az RAR α és az RXR receptorok szintetikus ligandjai indukálják a TG2 kifejeződését DEX-kezelt apoptotikus timocitákban

Mivel előző kísérletünk során a 9-cisz retinsav, mely az RAR és RXR receptorokat egyaránt aktiválja, hatékonyabban bizonyult minden kísérleti elrendezésben, mint a csak RAR-t aktiváló ATRA, ezért szintetikus RXR agonistát (LG268) és szintetikus RAR α agonistát (AM580) alkalmazva tanulmányoztuk a retinsav receptorok szerepét a TG2 indukálásában. Az LG268 szignifikánsan növelte a TG2 kifejeződését minden egyes kísérleti elrendezésben. Azonban még

hatásosabb volt, amikor az RAR agonista AM580 –al együtt adtuk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy *in vitro* a retinoid és a TGF- β együttműködve szignifikánsan növelik a TG2 expressziós szintjét az elhaló timocitákban, és a mindkét oldalon aktivált RAR/RXR heterodimer közvetítheti leghatékonyabban a retinoidok hatását.

Az *in vivo* retinsav szintézis gátlása csökkenti az apoptózis-indukálta TG2 expressziót egér timocitákban

Következő lépésben, hogy azon feltevésünket bizonyítsuk, hogy a timuszban termelődő retinoidok hozzájárulhatnak a TG2 kifejeződéséhez az elhaló timocitákban, két különböző retinsav szintézis gátlószert használtunk. Ha hipotézisünk helyes, a retinsav szintézis gátlása az apoptózis kiváltását megelőzően, meggátolná vagy csökkentené a keletkező TG2 mennyiségét. Az egereket diszulfirammal, egy alkohol dehidrogenáz gátlószerral, vagy 4-dietil-amino-benzaldehiddel (DEAB), egy RALDHs inhibitorral oltottuk az apoptózis kiváltását megelőzően két napig. A korábban leírtaknak megfelelően a timociták *in vivo* apoptózisát intraperitoneális DEX injekcióval váltottuk ki, melyet egy nagy mennyiségű TG2 kifejeződés követ az elhaló timocitákban. Az egerek előkezelése diszulfirammal vagy DEAB-al szignifikánsan csökkentette a DEX által kiváltott TG2 expressziót, jelezve, hogy az endogén retinoid termelés hozzájárulhat a TG2 apoptózis-függő megjelenéséhez. Azonban a DEX által kiváltott TG2 kifejeződés soha nem gátlódott teljes mértékben, azt sugallva, hogy más szignálok szintén hozzájárulnak az enzim *in vivo* megjelenéséhez.

Egér timuszban az *in vivo* apoptózis kiváltása egy megnövekedett retinoid függő transzkripcióval társul

RARE-lacZ transzgén egereket használva szerettük volna bizonyítani, hogy mind a diszulfiram mind a DEAB kezelésnél alkalmazott koncentráció hatékonyan képes gátolni az *in vivo* retinoid szintézist. Ezek a transzgén egerek egy retinsav válaszadó elem (RARE) által szabályozott béta-galaktózidáz (lacZ) gént fejeznek ki. Az egerekben az *in vivo* retinoid-függő transzkripció aktivitást a lacZ gén megjelenése jelzi. Az *in vivo* retinoid szintézis gátlását követően indukáltuk a timociták apoptózisát – hasonlóan mint az előző kísérletben – majd meghatároztuk a retinoid-függő transzkripció aktivitást. Meglepetésünkre, a DEX kezelés önmagában indukált egy szignifikáns növekedést a lacZ riporter gén megjelenésében. A diszulfiram csak részleges gátlást tudott kifejteni, viszont a DEAB kezelés közel teljes mértékben meggátolta a β -galaktózidáz mRNS kifejeződését a timuszban. Eredményeink arra utalnak, hogy míg a diszulfiram csak részleges hatással bír addig a DEAB igen nagymértékben képes a retinoid-indukálta transzkripció gátlására, ezzel igazolva ezen

retinsav szintézis inhibitorok hatékonyságát. A diszulfiram koncentrációját nem lehetett tovább növelni, mivel az az egerekre nézve már halálos dózis lett volna.

A timociták *in vivo* apoptózisát fokozott RALDH1 és 2 kifejeződés, valamint egy megnövekedett retinoid-függő transzkripció aktivitás kíséri

Korábbi eredményeink alapján, a timuszban DEX által előidézett apoptózis során fokozódott a retinoid-függő transzkripció, ami felveti azt a kérdést, hogy amit láttunk az a DEX kezelés következtében kialakult válasz-e, vagy egy apoptózis specifikus reakció. Következő lépésként, hogy ezt a kérdést megválaszoljuk, a DEX alkalmazása mellett anti-CD3 antitestet is használtunk mely T sejt receptor által közvetített sejthalált vált ki, így indukálva a timociták apoptózisát a RARE-lacZ egerekben. Mindkét sejthalál stimulus fokozott retinoid-függő transzkripciót váltott ki, de a két különböző apoptotikus jel eltérő retinoid produkciót okozott a timuszban. A DEX hatása sokkal kifejezettebb volt. Mivel ez a mértékű lacZ transzkripció egy masszív retinoid termelést jelez a timuszban, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk két retinsav szintézisért felelős enzim a RALDH1 és 2 expressziós szintjét, melyekről korábban már bebizonyították, hogy jelen vannak a timuszban *in vivo* apoptózis kiváltását követően. Azt találtuk, hogy a timuszban lévő RALDH1 és 2 mRNS szintje szignifikánsan emelkedett az idő függvényében DEX oltását követően (24 óránál detektálva a legmagasabb az indukció). Az anti-CD3 antitest adása szintén fokozta a RALDHs enzimek szintjét. Mitöbb, a retinoid indukciót lacZ segítségével mért eredményeinkkel megegyezően, a DEX oltását követően a RALDH1 mRNS szintje sokkal szignifikánsabb növekedést mutatott, mint az anti-CD3 antitest adását követően, míg sokkal kisebb különbség volt kimutatható a RALDH2 esetében. A két apoptózis stimulusra adott válasz közötti különbséget valószínűleg az okozhatta, hogy a DEX-ből alkalmazott koncentráció egy sokkal jelentősebb mértékű apoptózis kiváltására képes a timuszban, ahogyan azt számunkra jelzik az oltásokat követően mért timuszok súlyok is.

A makrofágok az apoptotikus sejtek fagocitózisa során növelik a RALDH-ok kifejeződését, ami három lipid érzékelő receptor aktiválódásának következménye lehet

Ahogy előző eredményeink bizonyítják, a timusban apoptózis kiváltását követően, két retinsav szintetizáló enzim kifejeződése is növekszik, mely egy a timusban jelenlévő apoptózis-függő retinoid termelésre utalhat. A laborban folyt előző kutatások kimutatták, hogy a tímikus epiteliális sejtek képesek RALDH enzimeket kifejezni, de kevésbé tűnik valószínűnek, hogy ezek a sejtek lennének felelősek egy apoptózis-függő jelenségért. A mi feltételezésünk szerint, talán a timusban jelenlévő makrofágok érzékelik az apoptotikus timociták mennyiségét és erre válaszolnak egy fokozott RALDHs expresszióval. Mivel néhány éve publikálták, hogy a makrofágok az apoptotikus sejtek felvétele közben érzékelik az elhaló sejtek mennyiségét három lipid érzékelő receptor segítségével és ezt követően elősegítik az apoptotikus testek fokozott fagocitózását, így elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk vajon a RALDH kifejeződés változik-e az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágokban. Erre a célra hasüregi makrofágokat izoláltunk és apoptotikus timocitákkal vagy apoptotikus NB4 sejtekkel (melyek nagyobbak mint a timociták így több lipidet is tartalmaznak) inkubáltuk őket. Az apoptotikus timociták fagocitózisa fokozta a RALDH1 mRNS kifejeződését az őket felvevő makrofágokban, de a RALDH2 kifejeződése nem változott. Azonban ha ezek a makrofágok a nagyobb méretű apoptotikus NB4 sejteket fagocitálták, a RALDH1 kifejeződése tovább növekedett és a RALDH2 mRNS is indukálódott, tehát az indukció nem timocita specifikus. Az apoptotikus sejtek felvételével összefüggésben keletkező RALDH enzimek kifejeződését meggátolta a makrofágokon alkalmazott aktinomicin D kezelés, mely egy traszkripciót gátló vegyület, vagyis a folyamat szabályozása transzkripciós szinten történik. Ezt követően arra kerestük a választ, vajon a foszfatidil szerin felismerése az apoptotikus sejtek felszínén vagy az elhaló sejtek felvétele váltja-e ki a RALDH enzimek kifejeződését. Ehhez a fagocitózist a makrofágok citokalazin D kezelésével gátoltuk, mely az aktin polimerizációt gátolja de nincs hatással az apoptotikus sejtek felismerésére, vagy az apoptotikus sejtek felszínén lévő foszfatidil szerint eltakartuk rekombináns annexin V előkezeléssel, mely az apoptotikus sejtek felszínén a foszfatidil szerinhez kötődik. Mind a citokalazin D, mind a rekombináns annexin V meggátolta az apoptotikus sejt felvétel által indukált RALDH enzimek mRNS szintjének növekedését, azt sugallva, hogy az apoptotikus sejtek felvétele és nem önmagában a felismerése váltja ki a RALDH kifejeződését.

Mivel három lipid-érzékelő magreceptor ($LXR\alpha$, $PPAR\gamma$ és δ) is érintett lehet a makrofágok apoptotikus sejtekre adott válaszában, ezért megvizsgáltuk vajon ezeknek a receptoroknak az aktivációja befolyásolhatja-e a RALDH1 és 2 kifejeződését. Négy óra kezelést követően, mind a három agonista, vagyis az LXR ligand GW3965, a $PPAR\gamma$ ligand roziglitazon, és a $PPAR\delta$ agonista

GW1516, hozzájárulhat a RALDH1 mRNS szint növeléséhez peritoneális makrofágokban, és csak a GW1516 nem volt hatásos a RALDH2 kifejeződés indukálásában. Ezen megfigyelések alapján mindhárom lipid érzékelő receptor közvetítheti az apoptotikus sejtfelvétel hatását a RALDH enzimek kifejeződésére.

A thímuszban *in vivo* apoptózis kiváltását követően, az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok expresszálják a RALDH enzimeket

Bizonyítandó, hogy a thímuszban lévő makrofágok valóban képesek RALDH enzimek kifejezésére, 24 órával az *in vivo* timocita apoptózis (DEX által indukált sejthalál) kiváltását követően, fagyasztott thímusz metszetekben egyidejűleg festettük a makrofágokat és a két RALDH enzimet. Azt találtuk, hogy mindkét enzim a fagocitáló makrofágokban volt megtalálható DEX indukálta apoptózist követően.

A dexametazon RALDH1 mRNS kifejeződését indukálja makrofágokban

Mivel az *in vivo* DEX kezelés a thímuszban sokkal nagyobb mértékű RALDH1 indukciót okozott, mint az anti-CD3 antitest, megvizsgáltuk vajon egy *in vitro* DEX kezelés képes-e a makrofágok RALDH1 kifejeződésére hatni. A makrofágok DEX kezelését követően a RALDH1 szint szignifikánsan megemelkedett, míg a RALDH2 kifejeződésében nem történt változás. Eredményeink azt mutatják, hogy timocita apoptózis kiváltása a thímuszban RALDH kifejeződést indukál és az apoptózis kiváltásához használt DEX önmagában is hozzájárulhat a RALDH1 mRNS szint megnövekedéséhez makrofágokban.

4.2. DEXAMETAZON KEZELÉS HATÁSÁRA A MAKROFÁGOK ÁLTAL TERMELT RETINOID ELŐSEGÍTI AZ APOPTOTIKUS SEJTEK HOSSZÚTÁVÚ FAGOCITÓZISÁT

A retinoid előállítása nélkülözhetetlen a glükokortikoid-indukálta efferocitózis fokozódáshoz az apoptotikus sejtek hosszútávú eltakarítása során

A következő kísérleteinkben bizonyítani akartuk, hogy a makrofágok *in vivo* DEX kezelése valóban retinoid szintézist vált ki a sejtekben. Ehhez olyan csontvelőből származó differenciáltatott makrofágokat használtunk melyeket a RARE-lacZ transzgén egerekből izoláltunk. Ezekben az egerekben a pozitív X-gal festődés az endogén retinoid-függő lacZ expressziót mutatja a makrofágokban. A makrofágokat 24 óráig kezeltük 1 μ M DEX-al. A dexametazont önmagában vagy a retinaldehid dehidrogenáz inhibitor DEAB-al együtt alkalmaztuk. A 24 órás DEX kezelés lacZ kifejeződést váltott ki a makrofágokban, mialatt sem a kontroll kezelés, sem a DEX és DEAB-al kezelt sejtek nem mutattak pozitív reakciót. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a DEX képes fiziológiás szempontból jelentős mértékű retinoid termelés kiváltására makrofágokban, és a DEAB az általunk alkalmazott koncentrációban meggátolja a retinoid keletkezését.

A laborunkban folyt korábbi kutatások kimutatták, hogy a retinoidok megnövelhetik a makrofágok fagocitáló képességét. Ezért megvizsgáltuk, vajon az apoptotikus sejtek fagocitózisában a DEX által kiváltott növekedés függhet-e a DEX-indukálta retinoid szintézistől. Ezen kérdés megválaszolásához a DEX kezelt makrofágokhoz DEAB-ot is adtunk, és meghatároztuk a sejtek fagocitáló képességét. Mint ahogyan az irodalomból is ismert, a BMDM-ok kezelése 1 μ M DEX-al jelentősen növeli a sejtek fagocitáló képességét azáltal, hogy növeli az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágok százalékát.

A DEX hatása időfüggő, BMDM-oknál 12 órás kezelést követően bizonyult hatásosnak a fagocitózis fokozásában és a maximális hatása 18 óra kezelést követően volt látható. DEAB adása nem befolyásolta a glukokortikoid-indukálta efferocitózis fokozódást, ha 12, 18 vagy 24 órával a DEX kezelés letelte után, fél óra apoptotikus sejttel való inkubálást követően mértük a sejtek fagocitáló képességét. Ezért a DEX hatását nem csak egy rövid távú fagocitózis során teszteltük, de egy hosszú távú efferocitózis alatt is, ekkor a DEX kezelt BMDM-ok 3 órán keresztül folyamatosan fagocitálhatták a nem jelölt apoptotikus timocitákat, majd a makrofágok apoptotikus sejt felvevő képességének meghatározásához fél óráig fagocitáltattuk a fluoreszcensen jelölt apoptotikus timocitákat. A 3 óráig elnyújtott fagocitózis önmagában csak kevésbé növelte az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok százalékát. Azonban, amikor a DEX kezelt makrofágokat használtunk, nőtt a fagocitáló sejtek százaléka és ez a növekedés gátolható volt DEAB adásával. Ezek az eredmények

azt sugallják, hogy a retinoidok közvetíthetik a glükokortikoidok efferocitózis fokozó hatását az apoptotikus sejtek hosszútávú fagocitózisa során.

A glükokortikoidok különböző lipid érzékelő magreceptorok kifejeződését váltják ki a RALDH1 expresszió fokozódását megelőzően

Mivel korábbi kísérleteink során azt találtuk, hogy különböző lipid érzékelő magreceptorok előidézik a RALDH enzimek kifejeződését, tudni szeretnénk volna valyon a dexametazon ezen lipid érzékelő receptorokon keresztül váltja-e ki a RALDHs kifejeződést. Korábbi eredményeinkkel megegyezően, a RALDH1 kifejeződése nőtt meg a makrofágok dexametazon kezelés után, és az expressziós szint a glükokortikoid adását követő 24 óráig növekedett. A DEX szignifikánsan emelte az LXRs és a PPAR δ mRNS és fehérje szintjét is csakúgy, mint heterodimerizációs partnerük az RXR α kifejeződését, mely maximumát 12 órai DEX kezelésnél érte el. Egy másik lipidérzékelő magreceptor a PPAR γ kifejeződése csökkent a DEX kezelés hatására. Mivel az LXRs ligálása szintén elengedhetetlen a receptortól kezdődő jelátviteli út elindításához és ismert, hogy a mitokondriális szterol 27-hidroxiláz (CYP27) egy LXRs ligandot (27-hidroxi-koleszterol) termel, megvizsgáltuk a DEX kezelést követően a CYP27 kifejeződését a makrofágokban. Az enzim valóban indukálódik a makrofágokban 4 óra DEX kezelés után. Mitöbb, a CYP27 indukciója csak részben volt gátolható egy fehérje szintézis inhibitor, a cikloheximid jelenlétében, ami arra utalhat, hogy talán egy közvetlen glükokortikoid target génről lehet szó. Valóban, irodalmi adatok alapján a humán CYP27 gén promóterében valóban van glükokortikoid válaszadó elem. Másrészt, a vizsgált lipid érzékelő magreceptorok indukciója teljes mértékben gátolható volt 20 μ M cikloheximid használatával azt sugallva, hogy új fehérje vagy fehérjék (pl. egy új transzkripciós faktor) szintézise szükséges ezen magreceptorok fokozott kifejeződéséhez.

A dexametazon növeli az RAR α és a C/EBP β génexpressziós szintjét makrofágokban

A következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a RALDH1 kifejeződése hogyan szabályozódik a DEX kezelés által makrofágokban. Korábban azt találtuk, hogy az LXRs ligálása megnöveli a RALDH1 mRNS szintjét makrofágokban és az irodalmi adatok is arra utalnak, hogy két útvonalon keresztül is lehetséges a RALDH1 indukálása az LXR által. Egyrészt, az LXR közvetlenül kiválthatja a szterol válaszadó elem kötő fehérje (SREBP-1c) transzkripcióját a promóterében jelenlévő két LXR válaszadó elemen keresztül, így az SREBP-1c szabályozhatja a RALDH1 kifejeződését. Másrészt az RAR α és a CCAAT/enhanszer kötő fehérje (C/EBP) β egyidejűleg hatva szabályozhatják a RALDH1 kifejeződését, ahol az LXR irányítja az RAR α gén expressziós szintjét. Ezért teszteltük,

vajon az LXR részt vesz-e a DEX által fokozott RALDH1 kifejeződésben, valamint mértük a fent említett gének mRNS szintjét DEX kezelt makrofágokban. Az általunk használt kísérleti rendszerben az SREBP-1c kifejeződése nem változott DEX adását követően, de mind az RAR α mind a C/EBP β kifejeződése megnövekedett a DEX kezelt makrofágokban. Míg a DEX által kiváltott RAR α indukció a cikloheximid adásával teljesen meggátolható volt a makrofágokban, addig a C/EBP β mRNS szintje emelkedést mutatott a cikloheximid kezelést követően. Ezen megfigyelés egy instabil negatív szabályozó fehérje vagy fehérjék közreműködésére utalhat a C/EBP β mRNS szintjének szabályozásában, és a glükokortikoidok talán ezen instabil gátló fehérje/fehérjék megjelenését gátolva fejtik ki indukáló hatásukat a C/EBP β expresszióra.

A RALDH1 expresszió kiváltásához az LXR-indukálta RAR α és a DEX-indukálta C/EBP β kifejeződése szükséges

Tovább vizsgáltuk a C/EBP β , az LXR és az RAR α szerepét a DEX által kiváltott efferocitózis folyamatában, ezért gécnsendesítést alkalmaztunk az LXRs és C/EBP β génekre vonatkozóan a DEX kezelt makrofágokban. Azt találtuk, hogy a C/EBP β csendesítése meggátolta a DEX-indukálta LXR α kifejeződést, jelezve számunkra, hogy a DEX kiváltotta LXR α mRNS fokozódás a C/EBP β által közvetített. Szintén megfigyeltük, hogy a DEX által előidézett növekedés az RAR α mRNS szintjében az LXRs csendesítésével meggátolható, ami egybevág azzal az irodalmi adattal, hogy az RAR α egy LXR célgén. Továbbá, a C/EBP β csendesítése is meggátolta a DEX-indukálta RAR α expresszió fokozódást, mivel az RAR α LXR függő módon indukálódik és az LXR indukció C/EBP β siRNS-el megakadályozható. Másrészt, az LXR csendesítése nem gátolta a DEX-indukálta fokozott RXR α kifejeződést, arra utalva, hogy az RXR α nem egy közvetlen LXR célgén. Azonban az RXR α DEX által előidézett expressziós növekedése szintén C/EBP β -függő.

Mivel a DEX-indukálta RAR α keletkezéséhez szükséges LXR vagy a C/EBP β csendesítése gátolja a RALDH1 kifejeződését a DEX kezelt BMDM-okban, valamint a pan RAR antagonistá AGN109 vagy az RAR α genetikai eltávolítása szintén meggátolja a DEX-indukálta RALDH1 kifejeződését, az RAR α meghatározó szerepet tölthet be a RALDH1 szabályozásában. Összességében, ezek az eredmények azt mutatják, hogy a glükokortikoidok a C/EBP β fokozott kifejeződését váltják ki makrofágokban, mely hozzájárul az LXRs és az RXR α indukációjához. A glükokortikoidok szintén előidézik a CYP27 mRNS szint növekedését, mely egy endogén ligandot szolgáltat az LXRs magreceptorok számára. Az RAR α , LXR/RXR-függő módon indukálódik és nélkülözhetetlen a RALDH1 kifejeződés növekedéséhez. Noha korábbi tanulmányok szerint a C/EBP β közvetlenül befolyásolhatja a RALDH1 indukcióját, de az RAR α indukcióhoz is hozzájárul a DEX által

szabályozott LXR útvonalon keresztül, így eredményeink nem bizonyítják, hogy a C/EBP β közvetlen szabályozó szerepet játszana a RALDH1 kifejeződésében a DEX kezelést követően.

A glükokortikoidok C/EBP β -függő módon idézik elő a MERTK, C1q és UCP2 kifejeződés növekedését BMDMs-ban

Ezt követően szeretnénk volna megtudni, milyen efferocitózis-kapcsolt molekulák érintettek a makrofágok DEX kezelésénél. Számos gén kifejeződését megvizsgáltuk és korábbi közleményekkel összhangban azt találtuk, hogy a MERTK kifejeződése volt a legkiemelkedőbb a fagocitózis-kapcsolt gének közül, a makrofágok DEX kezelését követően. DEX adását követően a MERTK nagyon korán indukálódott és ez a fokozódás csökkenthető volt cikloheximid adásával és a C/EBP β csendesítésével mutatva, hogy a C/EBP β közreműködik a MERTK mRNS szint növekedésében. Habár, korábbi tanulmányok a MERTK-t egy közvetlen LXR célgénként azonosították, az LXR-ok csendesítése nem hatott szignifikánsan a MERTK DEX-indukálta expresszió növekedésére, arra utalva, hogy bár a C/EBP β közreműködik az indukciójában, az független az LXR kifejeződésére gyakorolt hatásától. Mivel irodalomból ismert, hogy a PPAR δ -/- egerek esetében egy csökkent MERTK kifejeződés tapasztalható a makrofágokban, mértük a DEX-indukálta MERTK kifejeződést a PPAR δ antagonistá GSK3787 jelenlétében is. Kísérleteinkben a PPAR δ gátlása nem volt hatással a MERTK megjelenésére, vagyis a PPAR δ nem szabályozza a MERTK kifejeződését DEX kezelt makrofágokban.

Egy korábbi publikációval megegyezően azt találtuk, hogy a DEX egy hídképző molekula a C1q kifejeződését is befolyásolja. A DEX kiváltotta C1q mRNS szint növekedést nem gátolta a cikloheximid, vagyis egy új fehérje szintézise nem szükséges a korai indukció kiváltásához. De a C/EBP β és az LXR-ok jelenléte elengedhetetlen a C1q hosszútávú növekedéséhez, melyet 21 óra DEX kezelés után mértünk, ugyanakkor úgy tűnik, hogy a PPAR δ nem vesz részt ezen molekula DEX-indukálta szabályozásában.

Végül, mértük a glükokortikoid függő UCP2 indukciót, melynek mRNS szintje szintén nagyon korán megemelkedett a DEX kezelés után. Habár az UCP2 rövid távú indukciója nem függ új fehérje szintézisétől, mind a C/EBP β mind a PPAR δ megfelelő szintű kifejeződése szükséges volt a hosszútávú (21 óra) indukciójához. Más fagocitózis-kapcsolt molekulák, mint például az MFG-E8, a CD36, a CD91, a stabilin-2 és a CD14 kifejeződése nem változott, míg a transzzglutamináz 2, az integrin β 3, és a TIM4 kifejeződése csökkent a DEX kezelt csontvelőből differenciáltott makrofágokban. Eredményeink megerősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, miszerint a

glükokortikoidok a fagocitózis-kapcsolt molekulák egy speciális csoportjának fokozott kifejeződését váltják ki, továbbá kimutattuk, hogy ezen molekulák hosszú távú glükokortikoid indukálta kifejeződéséhez a lipid érzékelő magreceptorok és a C/EBP β szint növekedése szükséges.

Az LXR-ok és a PPAR δ közreműködnek a glükokortikoid-indukálta fagocitózis fokozódásban a hosszútávú efferocitózis folyamatában

Ahogy a bevezető részben leírtam, korábbi tanulmányok bemutatták, hogy az LXR-ok és a PPAR δ magreceptorok aktiválódnak a makrofágokban az apoptotikus sejt lipid tartalma által, mialatt a makrofágok folyamatosan fagocitálják az apoptotikus sejteket. Mivel a DEX szignifikánsan növeli ezeknek a magreceptoroknak a kifejeződését, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk vajon az LXR-ok csendesítése, vagy a PPAR δ gátlása a GSK3787 antagonistával befolyásolhatja-e a glükokortikoid efferocitózist fokozó hatását. Eredményeink azt mutatták, hogy az LXR-ok csendesítése, vagy a PPAR δ transzkripcióis aktivitásának gátlása a GSK3787 adásával nincs hatással az efferocitózisra, amennyiben azt közvetlenül a 24 órás DEX kezelés után mértük. Ezek az adatok megegyeznek azzal a megfigyelésünkkel, hogy a magreceptorok nem hatanak a glükokortikoid-indukálta MERTK kifejeződésére, amelyről korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a rövid távú glükokortikoid-indukálta efferocitózis növekedést irányítja. Másrészt, a C/EBP β csendesítése, amely csökkentette a glükokortikoid által megnövelt MERTK kifejeződést, szintén csökkentette a glükokortikoid hatást a rövidtávú efferocitózisra. Azonban ha az efferocitózis mértékét a hosszútávú fagocitózis alatt mértük, mind az LXRs csendesítése mind a PPAR δ transzkripcióis aktivitásának gátlása csökkentette a glükokortikoid fagocitózis fokozó hatást. A C/EBP β gén (ami eredményeink alapján az LXR-ok és a PPAR δ indukcióhoz is szükséges) csendesítése szintén meggátolta a glükokortikoidok fagocitózist fokozó hatását a hosszútávú efferocitózis során. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az LXR-ok és PPAR δ magreceptorok közvetítik a glükokortikoidok fagocitózist fokozó hatását a hosszútávú efferocitózis folyamatában.

A hosszútávú fagocitózis során az LXR α , RXR α , RAR α és PPAR δ mRNS szintje megnövekszik és ez kifejezettebb dexametazon kezelést követően

Mivel eredményeink alapján a lipid érzékelő receptorok nélkülözhetetlenek a glükokortikoid-indukálta efferocitózis fokozódáshoz az apoptotikus sejtek hosszú időn keresztül történő felvétele során, megvizsgáltuk, hogy a magreceptorok kifejeződése hogyan változik ezalatt a hosszú ideig tartó apoptotikus sejt eltávolítás alatt. Megfigyeltük, hogy a 3 óráig tartó hosszútávú fagocitózis

önmagában növelte az LXR α , PPAR δ , RAR α és RXR α kifejeződését, mivel az apoptotikus sejtek lipid tartalma aktiválta mind az LXR mind a PPAR δ által indított jelátviteli utakat. Az LXR α és az RXR α mRNS szintje tovább növekedett a hosszútávú fagocitózist követően a DEX kezelt makrofágokban. Az UCP2 kifejeződése szintén tovább fokozódott a makrofágok apoptotikus sejtekkel való etetését követően, de csak kis mértékben nőtt tovább, ha még DEX kezelést is alkalmaztunk.

A RALDHs enzimek gátlása DEAB-al csökkentette a magreceptorok glükokortikoid-indukálta és a hosszútávú fagocitózis-indukálta kifejeződését

Ezt követően teszteltük, hogy a DEAB általi RALDH gátlás hogyan befolyásolja a retinoid által szabályozott magreceptorok és az UCP2 kifejeződését a DEX által fokozott hosszútávú fagocitózis során. A RALDH gátlása csökkentette a glükokortikoid és a hosszútávú fagocitózis indukálta növekedést ezen lipid érzékelő receptorok kifejeződésében, jelezve a retinoidok pozitív önszabályozó szerepét mindkét útvonalban. Hasonló expressziós mintázatot mutatott az UCP2 is, mivel PPAR δ target gén. Eredményeink megerősítik korábbi adatainkat, miszerint az LXR jelátviteli útvonala tartalmaz egy retinoid-függő önszabályozó erősítő hurkot és most ezen megfigyelésünket kiterjeszthetjük a glükokortikoid-indukálta lipid érzékelő jelátviteli útvonalra is.

5. MEGBESZÉLÉS

A makrofágok retinoidot termelnek az apoptotikus sejtek fagocitózisa során, mely közreműködik a TG2 kifejeződésében timocitákban

A sejthalál folyamata alapvető fontosságú az élethez és a soksejtű szervezetek homeosztázisának fenntartásához, különösen azokban a szervekben ahol igen gyakori a sejtek cserélődése, mint például a csontvelőben vagy a bélben. Az apoptózis szintén nélkülözhetetlen a nem-funkcióképes vagy autoreaktív immunsejtek eltávolításához, pl. a központi limfoid szervek érése során (csontvelő, timusz). Egészséges egyénekben 50-70 billió sejt hal el minden nap apoptózissal. Ezeknek az apoptotikus sejteknek a fagocitózisa elengedhetetlenül fontos az életünk során, mivel az el nem takarított apoptotikus sejtek másodlagosan nekrotikussá válhatnak, melynek következményeként a sejtől kiürülhet a gyulladásokkeltő sejt tartalom így roncsolva a szöveti környezetet és autoimmunitást idézve elő.

A timusz egy egyedülálló mikrokörnyezetet biztosít a fejlődő és érő T sejtek számára. A timuszban egy szorosan szabályozott fejlődési folyamatot követően, mindössze a timociták 1%-a jut ki a perifériára és csatlakozik a szervezet limfocita készletéhez. Mivel a differenciálódó timociták több mint 95%-a apoptózissal elhal, és ezt követően a timikus makrofágok által egy gyors és hatékony fagocitózis által felvételre kerül, az apoptotikus program hatékony elindítása és befejezése – a TG2 részvételével – nélkülözhetetlen a timuszban. Ez az apoptotikus sejtek és a fagociták közötti komplex kommunikáció jól tanulmányozható *in vivo* a timuszban.

A TG2 indukálódik és aktiválódik azokban a sejtekben melyek apoptózissal halnak el. A timuszban az *in vivo* apoptózis kiváltását követően az enzim magas szintje detektálható az apoptotikus timocitákban, mint az apoptózis program egy korai eseménye még a DNS töredezése előtt, jelezvén a TG2 szerepét az apoptózis kezdeti szakaszában. Valóban a TG2 túlzott kifejeződése önmagában is képes a T sejtek elhalását kiváltani. Emellett, a TG2 közreműködik a keresztkötött fehérje polimerek létrehozásában az apoptotikus testekben, ami megakadályozza a káros sejtartalom kiömlését a sejtől. Azonban a timocitákban *in vitro* a TG2 nem indukálódik apoptózis során, a sejtek mégis megfelelően elhalnak a TG2 hiányában is. Ezen megfigyelés arra utal, hogy bár a TG2 közreműködhet a timociták apoptózisában, nem szükséges a sejthalál kiváltásához. Valamint azt is jelzi, hogy olyan faktorok szabályozzák a TG2 kifejeződését a timocita apoptózis során, melyek csak a szöveti környezetben vannak jelen.

Kísérleteimben, a TG2 kifejeződés szabályozódását vizsgáltam apoptotikus timocitákban. Mivel az elhaló timociták fagocitózisa a tímikus makrofágok által egy állandóan zajló folyamat a tímuszban, a fagocitáló makrofágok folyamatosan különféle molekulákat bocsátanak ki az efferocitózis következményeként és egy speciális tímikus környezetet hoznak létre a fejlődő timocitáknak. Ezek a molekulák a TG2 expresszió lehetséges szabályozói. Korábbi irodalmi adatok azt mutatták, hogy a TGF- β , egy kifejezetten az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok által kibocsájtott citokin, az egyik lehetséges faktor, amely szabályozhatja a TG2 *in vivo* kifejeződését az elhaló sejtekben, promóterén lévő TGF- β válaszadó elem segítségével. Azonban, a laborban folyt korábbi kísérletek alapján tudjuk, hogy a TGF- β nem igazán hatásos a TG2 expresszió kiváltásában, ezért kerestem más jelöltet, mely felelős lehet az elhaló timocitákban látható nagymértékű TG2 kifejeződésért. Mivel ismert volt, hogy a retinoidok a TG2 géntranszkripció közvetlen szabályozói lehetnek és a laborunkból származó *in vivo* eredmények szintén kimutatták, hogy a retinoidok jelen vannak az eger tímuszban, kísérleteimben vizsgáltam, hogy a retinoidok lehetséges közreműködők-e a TG2 kifejeződés kiváltásában az elhaló timocitákban.

Kísérleteim során kimutattam, hogy az *in vitro* retinsav és TGF- β együttesen szignifikánsan képes növelni a TG2 mRNS szintjét az elhaló timocitákban, és az apoptotikus jel hozzájárul a TG2 indukálásához. Szintén bemutattam, hogy a retinsav szintézis gátlása alkohol- vagy retinaldehid-dehidrogenázok által jelentősen csökkenti az *in vivo* TG2 indukciót apoptózis kiváltása után, arra utalva, hogy a retinoidok valóban közreműködnek az *in vivo* megjelenő fokozott TG2 kifejeződéshez. Azt találtam, hogy a retinoidok nem csak közreműködnek a TG2 kifejeződésében, azáltal hogy állandóan jelen vannak a tímikus környezetben, de a timociták *in vivo* apoptózisának kiváltását egy fokozott retinoid függő transzkripció aktivitás kíséri a tímuszban. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban, az *in vivo* apoptózis indukciót a tímuszban a tímikus makrofágok fokozott RALDH1 és 2 kifejeződése kíséri. Habár a tímusz kérgi és velő állományában lévő epitálialis sejtekről korábban kimutatták, hogy kifejeznek RALDH enzimeket, eredményeink alapján feltételezhető, hogy a TGF- β -hoz hasonlóan, a születést követően a retinoidokat is fagocitózis függő módon az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok termelik. Kimutattam, hogy az apoptotikus sejtek által indukált retinoid termelésben közreműködhet három lipid érzékelő magreceptor (LXRs, PPAR δ and PPAR γ). Ezen eredmények alapján a laborban folyt következő kísérletek kimutatták, hogy az LXR szignálút vonal retinoidok termelésén keresztül segíti elő az apoptotikus sejtek fagocitózását.

Dexametazon kezelés hatására a makrofágok által termelt retinoid hozzájárul az apoptotikus sejtek hosszútávú fagocitózisaához

Bemutattam, hogy az *in vivo* DEX kezelés sokkal hatékonyabb volt a retinoid-függő transzkripció aktivitás (lacZ mRNS expresszió) növelésében, mint az anti-CD3 antitest, annak köszönhetően, hogy az alkalmazott koncentrációban a DEX sokkal hatásosabban váltja ki a timociták apoptózisát, így több a makrofágok által felvett sejt, és több fagocitózis-függő retinoid termelődhet. Azonban azt is kimutattam, hogy a DEX önmagában is képes a RALDH1 kifejeződést fokozni a makrofágokban, így a DEX önmagában is hozzájárulhat a tímuszban a DEX kezelés által kiváltott *in vivo* lacZ kifejeződéshez. Mivel az *in vitro* DEX kezelés növeli a makrofágokban a RALDH1 mRNS szintjét, és a laborban folyt korábbi kutatások kimutatták, hogy a retinoidok növelik a makrofágok fagocitáló képességét, elhatároztuk, hogy megvizsgáljuk vajon a RALDH1 kifejeződés növekedése képes-e egy fiziológiásan releváns retinoid termelést indukálni a makrofágokban amely közreműködhet a DEX efferocitózis fokozó hatásában.

Az apoptotikus sejtek ritkán láthatóak *in situ* a tímuszban. Ez az igen hatékony efferocitózissal való apoptotikus sejt eltávolítás következménye, mely meggátolja a másodlagos nekrozist és ennek következtében a gyulladásokeltető sejtartalom kiürülését is a sejtől. Önmagában az apoptotikus sejtek érzékelése és eltávolítása is gyulladásgátló választ vált ki makrofágokban. Ezért, a nem megfelelő apoptotikus sejt eltávolítás genetikai rendellenességek és/vagy egy állandó betegségi állapot eredményeként közreműködhet autoimmun betegségek kialakulásában. A legtöbb ilyen típusú betegség nagyon jól kezelhető glükokortikoid adásával. Habár sok mechanizmust azonosítottak már, melyeken keresztül a glükokortikoidok csökkentik a gyulladásos választ, egyre több bizonyíték utal arra, hogy az apoptotikus sejtek felvételének növelése egyike e mechanizmusoknak, így a glükokortikoidok efferocitózis fokozó hatásának vizsgálata segíthet megérteni hogyan valósul meg immunsuppresszáns hatásuk.

Korábbi tanulmányok leírták, hogy a glükokortikoidok különféle efferocitózis-kapcsolt gének, úgy mint a MERTK, trombospondin-2, MFG-E8 vagy a sejtfelszíni CD91 fagocita receptor kifejeződését növelve képesek fokozni az apoptotikus sejtek rövidtávú fagocitózását. A mi kísérleti rendszerünket alkalmazva, megerősíthetjük a glükokortikoidok rövid távú efferocitózisra gyakorolt fokozó hatását, és a MERTK indukcióját, de az MFG-E8 kifejeződése nem növekedett a BMDMs-ban. Megfigyeléseinkkel megegyezően, ha MFG-E8 hiányos egereket egy héten át dexametazonnal kezelték, mely hat a makrofágokra és kiváltja a timociták elhalását is a tímuszban, nem találtak eltérést az *in vivo* efferocitózis mértékében vagy a megmaradt tímusz méretében. Azonban tioglikolátnak-kitett makrofágokat használva a dexametazonra adott válasz MFG-E8 függő volt, és

mi is növekedést tapasztaltunk az MFG-E8 kifejeződésében, ha hasüregi makrofágot használtunk, ami arra utalhat, hogy az MFG-E8 kifejeződés DEX-ra adott válasza függhet a makrofág típusától.

Kimutattuk egy másik hídképző molekula a C1q mRNS szintének fokozódását is. Ismert, hogy a C1q kötődik és aktiválja a CD91 fagocita receptort, amelynek sejtfelszíni kifejeződését a DEX indukálja. Amíg a CD91 a GULP-függő, addig a MERTK a Dock/Elmo-függő jelátviteli utat aktiválja a Rac aktiváció kiváltásához. Vagyis a MERTK és a C1q DEX általi egyidejű indukciója azáltal is fokozhatja az efferocitózist, hogy mindkét szignálút egyszerre okozza a Rac aktivációját. Továbbá a C1q nem csak CD91 ligandként szolgálhat, hanem ahogy nemrégiben leírták elősegítheti a MERTK-függő efferocitózist az adiponektin szignálút aktiválásával. Ez a jelátviteli út az AMP-aktivált protein kinázt aktiválja, amely elősegíti az apoptotikus sejtek fagocitózisát. Mivel a MERTK és a C1q kifejeződés növekedése is a DEX által indukált C/EBP- β transzkripciós faktor jelenlétét igényli, így a C/EBP- β csendesítése meggátolja a DEX fokozó hatását a rövid távú fagocitózisra.

A fagocitózis receptorokon és hídképző molekulákon felül, új megfigyelésem, hogy a DEX fokozza különféle magreceptorok kifejeződését is, úgy mint az LXR α , RXR α és PPAR δ , C/EBP β -függő módon. A C/EBP- β transzkripciós faktorról leírták, hogy nélkülözhetetlen a makrofágok differenciálódásához és működéséhez. Eredményeim azt mutatják, hogy a DEX a glükokortikoid-függő transzkripció kiváltásához vagy elősegítéséhez növeli a C/EBP β kifejeződését.

Kimutattam, hogy az UCP2 mRNS szintje, PPAR δ függő módon növekszik meg DEX kezelt makrofágokban, ugyanakkor az LXR a C1q és az RAR α szintjének fokozásához, és az RAR α által szabályozott RALDH1 mRNS szint növeléséhez elengedhetetlen. Más RALDH enzimek szabályozását nem vizsgáltuk munkánk során, de a RALDH enzimek által termelt retinoid elősegítette a magreceptorok indukcióját egy pozitív önszabályozó folyamat részeként. E visszaható indukció pontos mechanizmusát nem vizsgáltuk, de ismert, hogy az LXR-ok és a PPAR δ permisszív magreceptorok, így az RXR retinoid kötő helyén keresztül is aktiválhatóak. Továbbá, az LXR-ok esetében bizonyították, hogy a promóterében van LXR kötő hely. Így ligálását követően, a LXR-ok elősegítik saját transzkripciójukat a pozitív önszabályozó folyamaton keresztül. A DEX indukálta rövid távú efferocitózis nem igényel *de novo* retinoid szintézist, és se nem LXR- se nem PPAR δ -függő. Ennek az lehet az oka, hogy 1.) a megnövekedett MERTK kifejeződés felelős a DEX általi efferocitózis fokozódásért, ez azonban LXR- és PPAR δ -független módon szabályozódik 2.) ezen magreceptorok által kiváltott anyagszere változások, mint például az UCP2 szint megemelkedése csak a hosszútávú fagocitózis fenntartásához szükségesek, amikor a makrofágoknak már nem csak bekebelezni kell az elhaló sejteket, de a belőlük származó lebontott anyagaikat is kezelni kell 3.) bár

a C1q indukció LXR függő, szérum jelenlétében mely komplement faktorokat is tartalmaz, az LXRs csendesítés okozta C1q termelés hiánya a makrofágokban nem eredményez mérhető változást a DEX indukálta rövidtávú efferocitózis során. Azonban, a glükokortikoid indukálta hosszútávú fagocitózis, amikor a makrofágok 3 órán keresztül fagocitálhatták az apoptotikus sejteket, már LXR- és PPAR δ -függőnek bizonyult, és az LXR indukálta retinoid termelés is szükséges volt hozzá, összhangban azzal a megfigyeléssel, hogy ezeknek a magreceptoroknak a teljes aktiválása és kifejeződésének fokozása az endogén termelt retinoidok mennyiségétől is függ. Az apoptotikus sejtekből származó lipidek által aktivált magreceptorok, a fagocitózis receptorok kifejeződésének fokozása mellett, támogatják a hosszútávú fagocitózist is, valószínűleg anyagcsere változások előidézésén keresztül, úgy mint az UCP2 expresszió növelése, mely az apoptotikus sejtek folyamatos felvétele miatt keletkező lebontódó anyagok kezeléséhez szükséges.

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy a glükokortikoidok hozzájárulnak nem csak a rövidtávú, de a hosszútávú apoptotikus sejt fagocitózishoz is, és ezt úgy érik el, hogy az LXRs és a PPAR δ lipid érzékelő receptorok kifejeződését fokozzák, a keletkező retinoidok pedig egy pozitív önszabályozó hurokban szerepelve erősítik a lipid érzékelő receptorok transzkripcióját. Mivel a retinoidok közvetítik a glükokortikoidok hatását a hosszútávú efferocitózisa, a retinoidok a glükokortikoid kezelés hatékonyságának elősegítői lehetnek gyulladással járó betegségekben.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az apoptotikus sejthalál hatékony megvalósítását követő eredményes eltakarítás a professzionális fagociták és nem professzionális szomszédos fagociták által, egy kulcsfontosságú mechanizmus a szöveti homeosztázis fenntartásához. Minden nap a sejtek billiói halnak el és fagocitálódnak anélkül, hogy gyulladást és immunválaszt idéznének elő. Az apoptotikus és az őket felvevő sejtek által termelt transzzglutamináz 2 biztosítja az elhaló sejtek gyors felismerését és eltávolítását, valamint közreműködik a káros sejtartalom kibocsátás megakadályozásában is. A T sejtek a timuszban differenciálódnak és szelekciójuk folyamán az újonnan képződő sejtek 95%-a elhal majd eltakarítódik. Ezért az egér timuszban az apoptózis és a fagocitózis *in vivo* folyamata kitűnően tanulmányozható.

Az értekezésben bemutattam, hogy habár a TG2 indukálódik az *in vivo* elhaló timocitákban, nem fejeződik ki az *in vitro* apoptotikus timocitákban. A TG2 *in vivo* indukciójához a szöveti környezetben jelenlévő faktorokat igényel. Azt találtam, hogy ezeknek a faktoroknak egyike egy A vitamin származék mely a makrofágokban termelődik az aldehid és retinaldehid dehidrogenázok által, az apoptotikus sejtek fagocitózisa közben. Ezen retinoidok termelését a lipid érzékelő magreceptorok szabályozzák, úgy mint a PPAR-ok és LXR-ok, és elsősorban a fagocitáló makrofágok apoptotikus sejt felvevő képességére hatnak.

Azt találtam, hogy a retinoidokat nem csak az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok termelik, hanem a dexametazonnal kezelt makrofágok is képesek rá. Bemutattam, hogy a glükokortikoidok elősegítik mind a rövidtávú mind a hosszútávú apoptotikus sejt felvétel folyamatát. Úgy tűnik a glükokortikoidok közvetlenül indukálják fagocitózis-kapcsolt gének kifejeződését, mint a Mer tirozin kináz, a C1q, az UCP2 és a C/EBP β transzkripciós faktor. A C/EBP β közreműködik a fagocitózis-kapcsolt gének további növelésében és a lipid érzékelő receptorok, mint az LXRs, PPAR δ , RAR α , RXR α valamint a RALDH1 indukációjában, az utóbbihoz LXR- és RAR α -függő módon hozzájárulva. A hosszútávú efferocitózis glükokortikoid indukálta növekedése a lipid érzékelő receptorok indukációjától függ, melyekről ismert, hogy a bekebelezett sejtek lipid tartalma által indukálódnak, majd fokozzák az apoptotikus sejtek fagocitáló képességét. A retinoidok nem befolyásolják a glükokortikoid-indukálta rövidtávú apoptotikus sejt fagocitózist, de szükségesek a glükokortikoid-indukálta efferocitózis fokozáshoz az apoptotikus sejtek hosszú időn keresztül zajló eltakarításához, azáltal, hogy biztosítják az LXR és PPAR δ receptorok megfelelő szintű kifejeződését.

7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/216/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Garabuczi Éva
Neptun kód: HD9ZUD
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Garabuczi, É.**, Sarang, Z., Szondy, Z.: Glucocorticoids enhance prolonged clearance of apoptotic cells by upregulating liver X receptor, peroxisome proliferator-activated receptor- δ and UCP2.
Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. 1853 (3), 573-582, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.014>
IF: 5.019
2. Sarang, Z., **Garabuczi, É.**, Joós, G., Kiss, B., Tóth, K., Rühl, R., Szondy, Z.: Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes.
Immunobiology. 218 (11), 1354-1360, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.009>
IF: 3.18
3. **Garabuczi, É.**, Kiss, B., Felszeghy, S., Tsay, G.J., Fésüs, L., Szondy, Z.: Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes.
Amino Acids. 44 (1), 235-244, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1119-4>
IF: 3.653

További Közlemények

4. Kiss, B., Tóth, K., Sarang, Z., **Garabuczi, É.**, Szondy, Z.: Retinoids induce Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes.
Biochim. Biophys. Acta. 1853 (3), 660-670, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.035>

Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. • Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. • Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikacik@lib.unideb.hu • Honlap: www.lib.unideb.hu



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



5. Szondy, Z., **Garabuczi, É.**, Joós, G., Tsay, G., Sarang, Z.: Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: Therapeutic implications.
Front. Immunol. 5, 1-8, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00354>
6. Sarang, Z., Joós, G., **Garabuczi, É.**, Rühl, R., Gregory, C.D., Szondy, Z.: Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity.
J. Immunol. 192 (12), 5730-5738, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1400284>
IF:4.922
7. Szondy, Z., **Garabuczi, É.**, Tóth, K., Kiss, B., Kőröskényi, K.: Thymocyte death by neglect: Contribution of engulfing macrophages.
Eur. J. Immunol. 42 (7), 1662-1667, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201142338>
IF:4.97
8. Tóth, B., **Garabuczi, É.**, Sarang, Z., Vereb, G., Vámosi, G., Aeschlimann, D., Blaskó, B., Bécsi, B., Erdődi, F., Lacy-Hulbert, A., Zhang, A., Falsca, L., Birge, R.B., Balajthy, Z., Melino, G., Fésüs, L., Szondy, Z.: Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells.
J. Immunol. 182 (4), 2084-2092, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803444>
IF:5.646
9. Sarang, Z., Tóth, B., Balajthy, Z., Kőröskényi, K., **Garabuczi, É.**, Fésüs, L., Szondy, Z.: Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse.
Amino Acids. 36 (4), 625-631, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-008-0130-x>
IF:3.877

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,248

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 11,852

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermeti ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.10.12.



AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁS:

Garabuczi É. **What regulates the tissue transglutaminase expression in the dying thymocytes in vivo?** 2nd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Szlovákia, 2009. január 6-9

Garabuczi É. **Regulation of transglutaminase 2 expression in thymocytes undergoing apoptosis.** 3rd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Mariazell, Ausztria, 2010. január 7-10

Garabuczi É. **Retinoids might contribute to the upregulation of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes.** 4th Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Galyatető, 2011. január 11-14

Garabuczi É. **Dexamethasone might promote phagocytosis of apoptotic cells by macrophages via activating nuclear receptor pathways.** 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2012. január 4-7

Garabuczi É. **Glucocorticoids enhance phagocytosis of apoptotic cells by upregulating the expression of both phagocytic receptors and lipid sensing receptors.** 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2013. január 8-11

Garabuczi É. **Involvement of the LXR receptor in the glucocorticoid-induced enhancement of apoptotic cell phagocytosis.** 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2014. január 7-10

POSZTEREK:

Garabuczi Éva, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Regulation of transglutaminase 2 expression in thymocytes undergoing apoptosis.** Magyar Biokémiai Társaság 2009. Évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009. Augusztus 23–26

Garabuczi Éva, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Retinoids might be involved in the *in vivo* induction of transglutaminase 2 in dying thymocytes.** Transglutaminases in Human Disease Processes, Gordon Research Conferences, Davidson, NC, 2010. július 18-23

Garabuczi Éva, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Retinoids might be involved in the *in vivo* induction of transglutaminase 2 in dying thymocytes.** Magyar Biokémiai Társaság 2010. Évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. augusztus 25-28

Garabuczi Éva, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes.** Magyar Biokémiai Társaság 2010. Évi Vándorgyűlése, Pécs, 2011. augusztus 24-28

Garabuczi Éva, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes.** FEBS Advanced Course, Immune system: genes, receptors and regulation, Horvátország, Hvar, 2011. szeptember 3-10

Garabuczi Éva, Sarang Zsolt, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Dexamethasone might promote phagocytosis of apoptotic cells by macrophages involving lipid sensing nuclear receptor.** Annual Meeting of European Macrophage and Dendritic Cell Society, Debrecen, 2012. szeptember 1-3

Garabuczi Éva, Galuska Adrienn, Sarang Zsolt, Fésüs László, Szondy Zsuzsa. **Dexamethasone induced enhanced apoptotic cells phagocytosis in macrophages might involve lipid sensing nuclear receptor.** Apoptotic Cell Recognition & Clearance, Gordon Research Conferences and Gordon Research Seminars, University of New England, Biddeford, ME, 2013. június 22-28

8. KULCSSZAVAK

Apoptózis, makrofág, retinoid, dexametazon, TG2, timocita, efferocitózis, LXR, PPAR δ , UCP2